

## Patent- och Registreringsverket

**Stockholm**

NY ANSÖKAN OM SVENSKT PATENT

Handlägges av: K Larsson

Vår ref: 37876

7-  
950713 2105320 230 9502588-80 \*\*1600.00  
7-  
950713 2105321 234 9502588-8 \*\*2000.00

<b>UPPFINNINGENS BENÄMNING</b>	Hämning av tillväxten av bakterier i samband med absorberande alster med hjälp av tillsats av andra bakterier	
<b>SÖKANDE</b> (namn och adress)	Mölnlycke AB 405 03 Göteborg	
<b>UPPFINNARE</b> (namn och adress)	Rolf Andersson, Ulla Forsgren-Brusk, Bo Runeman, Stig E Holm och Eva Grahn Håkansson	
<b>BEGÄRAN OM PRIORITET</b> (datum, land och ansökningsnummer)		
<b>VID DEPOSITION AV MIKROORGANISM</b>	<i>Depositionsmyndighet</i>	<i>Depositionsnummer</i>
<b>VID AVDELAD ELLER UTBRUTEN ANSÖKNING</b>	<i>Stamansökningsnummer</i>	<i>Begärd löpdag</i>

### BILAGOR

- ☒ Beskrivning, patentkrav och sammandrag i 3 exemplar (avser fig. 1)
- ☒ 1 ritningar i 3 exemplar
- ☒ Överlåtelsehandling
- ☒ Fullmakt
- ☒ Utländsk text,
- ☒ Prioritetsbevis
- ☒ Ev. sekvenslista i maskinläsbar form

Stockholm den 13 juli 1995

**H. ALBIHNS PATENTBYRÅ AB**

### AVGIFT

- ☒ Grundavgift 1600:-
- ☒ Tilläggsavgift :- för patentkrav över 10
- ☒ Grundavgift 2000:- för ITS-granskning

*G. Höden*

H. ALBIHNS PATENTBYRÅ AB

Box 3137 • Tegnérsgatan 23 • S - 103 62 STOCKHOLM • SWEDEN • Tel +46 - (0)8 - 402 72 00 • Fax +46 - (0)8 - 10 19 23

ALBIHN WEST AB, GÖTEBORG • ALBIHN WILLQUIST AB, LINKÖPING

## Hämning av tillväxten av bakterier i samband med absorberande alster med hjälp av tillsats av andra bakterier

### Tekniskt område

- 5 Föreliggande uppfinning hänför sig till absorberande alster t ex blöjor, inkontinensskydd, dambindor och liknande artiklar och avser metoder, som syftar till att förhindra oönskad lukt och/eller förhindra tillväxt av oönskade mikroorganismer i samband med användning av nämnda artiklar.

### Problemområde

- 10 Absorberande alster av detta slag är kända i en mängd utföranden. Konventionellt framställs absorptionskroppen i dessa produkter, genom att cellulosamassa i t ex rullar, balar eller ark torrdefibreras och överförs i fluffad form till en massamatta, ibland med inblandning av s k superabsorbenter, vilka kan vara polymerer med förmåga att absorbera
- 15 flera gånger sin egen vikt av vatten eller kroppsvätska.

Vidare kan i absorptionskroppen ingå ytterligare beståndsdelar, för att exempelvis förbättra absorptionskroppens förmåga att ta emot eller sprida vätska, öka dess sammanhållningsförmåga och förmåga att motstå deformation under användning.

- 20 I samband med användning av absorberande alster av inledningsvis nämnt slag, kan det lätt uppstå oönskade lukter, som bl a orsakas av mikrobiell metabolism, biologisk eller kemisk nedbrytning av beståndsdelar i kroppsvätskor såsom t. ex. urin eller mensvätska.

- 25 Ett annat problemområde i samband med användning av absorberande alster är risk för infektioner som kan vara orsakade av patogena mikroorganismer.

- 30 Ett ytterligare problem är de arbetsmiljörisker, som kan uppstå vid hantering av använda blöjor med stort innehåll av mikroorganismer. Den tillväxt av mikroorganismer som kan ske i den använda blöjan vid lagring efter användning kan bidra till ökade luktproblem och kan öka risken för spridning av oönskade mikroorganismer.

Ett ytterligare problem är de olika former av hudirritationer och hudinfektioner, som kan orsakas direkt eller indirekt av mikroorganismer.

- Mikroorganismer eller deras produkter som är kända för att medverka till uppkomst av oönskade lukter, orsaka urinvägsinfektioner eller kan vara associerade till uppkomsten av hudproblem är t. ex. mikroorganismer såsom Proteus, Pseudomonas, Escherichia, Klebsiella, Enterococcus, Staphylococcus, Streptococcus och Candida.

### Teknikens ståndpunkt

- Olika sätt att komma tillrätta med de beskrivna problemen har föreslagits. I internationella patentansökan WO 91/11977 och WO 91/12031 beskrivs metoder att adsorbera önskad lukt i en zeolit, som placerats i det absorberande alstret. I amerikanska patentet US 4385632 beskrivs en tillsats av kopparsalt i en blöja för att förhindra nedbrytning av urea till ammoniak och därmed förhindra uppkomsten av obehaglig lukt.

- I amerikanska patentet US 3794034 beskrivs betydelsen av pH i ett absorberande alster och att impregnering av alstret med buffrande substanser med vars hjälp pH i alstret kan hållas mellan 3.5 och 6.0, vilket är fördelaktigt för såväl tillväxthämning av oönskade bakterier och därmed oönskade lukter som för att undvika negativ hudpåverkan. I de europeiska patenten EP 202127 och EP 311344 beskrivs reglering av pH i absorberande alster, som innehåller superabsorberande material. Eftersom många superabsorberande material kan påverkas negativt av närvaro av buffrande substanser, måste särskilda åtgärder vidtagas för att undvika oönskade effekter. I europeiska patentet EP 202127 placeras superabsorberande material respektive buffrande substanser i skilda zoner i det absorberande alstret. I europeiska patentet EP 311344 har de buffrande och de superabsorberande egenskaperna kombinerats i samma material, och dessutom har tillsatts en separat bakteriehämmande substans.

Nackdelen med de beskrivna metoderna är att vid tillsats av endast luktabsorberande medel, kan bakterierna fortfarande tillväxa, och de bakteriehämmande medlen, som ofta är selektiva, kan uppvisa risker t. ex. i form av allergena egenskaper, eller negativa ekologiska följder vid

avfallshantering. Vidare kan användning av denna typ av medel innebära en risk för uppkomsten av resistenta stammar.

Inom medicinsk teknik och livsmedelsteknik är det känt att använda biokonservering med hjälp av bakteriell antagonism som  
5 konserveringsmetod och i hälsobefrämjande syfte att inympa särskilda bakteriestammar för att favorisera för mage och tarm gynnsamma bakteriepopulationer. Som exempel kan nämnas konventionella yoghurt- och filprodukter men även nya bioaktiva livsmedel. Till denna metodik hör även användandet av bakterier som s.k. probiotika som ersättning för  
10 antibiotika.

Medicinsk användning av utvalda stammar av laktobakterier finns beskrivet i kanadensiska patentet CA 1298556 där bl a hela celler eller fragment av celler av *Lactobacillus* används för att behandla eller  
15 förebygga uppkomsten av urinvägsinfektioner. I internationella patentansökan WO 93/09793 beskrivs användning av laktobakterier och skummjölksberedningar för att förebygga urogenitala infektioner. I internationella patentansökan WO 92/13577 beskrivs en tampong eller dambinda, som impregnerats med en kultur av mjölksyraproducerande bakterier företrädesvis av genus *Pediococcus*, som isolerats från friska  
20 individer. Tampongen eller dambindan är avsedd för profylaktisk behandling av urogenitala infektioner.

#### Kortfattad beskrivning av uppfinningen

Syftet med föreliggande uppfinning är att åstadkomma ett absorberande alster av inledningsvis nämnt slag, som möjliggör användning av alstret  
25 även under längre tid, utan att därvid mikroorganismer tillåts tillväxa eller vara aktiva i sådan utsträckning att oönskad lukt uppstår, infektionsrisk uppstår, eller att negativ hudpåverkan uppstår. Ett ytterligare syfte med uppfinningen är att möjliggöra överföring av antagonistiska mikroorganismer till bäraren för att stärka förekomsten i bärarens  
30 perineum av sådan mikrobiologisk flora, som hjälper till att förhindra uppkomsten av urinvägsinfektioner. Dessa syften har genom uppfinningen uppnåtts, genom att till det absorberande alstret har tillsatts mikroorganismer, som vid regelbunden användning av det absorberande alstret under kortare eller längre tid uppvisar  
35 antagonistiska egenskaper mot, i det absorberande alstret eller i perineum

på bäraren av sagda alster, närvarande önskade stammar av mikroorganismer, och att sagda mikroorganismer är tillsatta i sådan mängd, och att sagda mikroorganismer har sådan aktivitet, att tillväxten av önskade species av mikroorganismer härvid förhindras.

## 5 Beskrivning av figurer

Fig. 1 visar den procentuella andelen av olika bakteriestammar, som uppvisar hämmad växt i närvaro av antagonistiska stammar.

### Detaljerad beskrivning av uppfinningen

- 10 Syftet med föreliggande uppfinning är att åstadkomma ett absorberande alster av inledningsvis nämnt slag, som möjliggör användning av alstret även under längre tid, utan att därvid mikroorganismer tillåts tillväxa i sådan utsträckning att önskad lukt uppstår, infektionsrisk uppstår, eller att negativ hudpåverkan uppstår. Ett ytterligare syfte med uppfinningen är att möjliggöra överföring av antagonistiska mikroorganismer till
- 15 bäraren för att stärka förekomsten i bärarens perineum av sådan mikrobiologisk flora, som hjälper till att förhindra uppkomsten av urinvägsinfektioner.

Exempel på bakterier som orsakar lukt är *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Escherichia coli* och *Klebsiella*.

- 20 Exempel på bakterier som orsakar urinvägsinfektioner är *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Enterococcus*, *Klebsiella*, *Staphylococcus* och *Streptococcus*.

Exempel på mikroorganismer som associeras till hudinfektioner är *Candida albicans*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus* och *Streptococcus*.

- 25 Uppfinningen grundar sig på mikrobiologisk antagonism. Detta innebär, att den ena mikroorganismen eller kombinationer av mikroorganismer hämmar andra mikroorganismer genom konkurrens om substrat, förändring av pH, bildning av enzymer, toxiner, koldioxid, peroxider eller antibiotiska substanser s. k. bakteriociner.
- 30 Antagonistiska mikroorganismer kan vara naturligt förekommande mikroorganismer, som är icke-toxiska och ej utövar någon negativ biologisk effekt på människa i form av infektion eller hudförändringar.

Antagonistiska mikroorganismer kan även vara framställda genom biotekniskt förfarande.

Genom att till det absorberande alstret tillsätta mikroorganismer, som uppvisar antagonistiska egenskaper mot sådana oönskade stammar av mikroorganismer, som är närvarande vid regelbunden användning av det absorberande alstret, kan tillväxten av de oönskade stammarna av mikroorganismer förhindras. Sagda tillsatta mikroorganismer måste då vara tillsatta i sådan mängd och ha sådan aktivitet, att den önskade effekten uppnås. Normalt erhålls denna effekt, då antalet antagonistiska mikroorganismer per absorberande alster överstiger  $10^6$  cfu, företrädesvis  $10^8$  cfu helst  $10^9$  cfu. Med regelbunden användning kan i detta fall avses t. ex. daglig användning av alster med byte flera gånger per dag, som är fallet med produkter, som är avsedda att användas av blöjbarn eller inkontinenta vuxna personer. Med regelbunden användning kan även avses sådan, som är aktuell för dambindor eller tamponger vid menstruation.

En fördel med att använda antagonistiska mikroorganismer är, att man undviker ett oönskat selektionstryck på mikromiljön såsom favorisering av potentiellt sjukdomsframkallande mikroorganismer och därmed risk för utveckling av patogena stammar, som är resistenta mot antibiotika och kemofarmaka. Eftersom det antimikrobiella systemet bygger på en naturlig, biologisk process, minskas risken för ekologiska och toxiska störningar på miljön.

En antagonistisk stam skall uppvisa tillväxthämmande effekt med gängse interferensteknik på flera av ovan nämnda oönskade mikroorganismer.

Andra krav på en önskad antagonistisk mikroorganism är överlevandeförmåga vid lagring och tillväxtförmåga eller förmåga att behålla sin aktivitet i det absorberande alstret vid användning.

De mikroorganismer som uppvisar antagonistiska egenskaper kan vara bakterier eller andra mikroorganismer t. ex. svampar. Om de antagonistiska mikroorganismerna är bakterier, kan dessa företrädesvis väljas ur genera *Lactobacillus* eller *Lactococcus* och helst ur species *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus plantarum* eller *Lactococcus lactis*.

- Ett absorberande alster enligt uppfinningen kan innefatta ett genomsläppligt ytmaterial avsett att vid användning vara vänt mot bäraren, ett företrädesvis vätsketätt baksidesmaterial avsett att vid användning vara vänt bort från bäraren och en absorberande struktur
- 5 placerad mellan ytmaterialet och baksidesmaterialet. I vissa fall kan ytterligare ett skikt i form av t. ex. en vadd eller liknande placeras mellan ytmaterialet och den absorberande strukturen. De mikroorganismer som uppvisar antagonistiska egenskaper kan vara placerade i olika delar av det absorberande alstret, i ytmaterialet, i den absorberande strukturen
- 10 hos det absorberande alstret, mellan två av skikten i det absorberande alstret, i en lös iläggsprodukt i det absorberande alstret eller på annat sätt.

Följande exempel illustrerar närmare effekten av antagonistiska bakteriestammar.

#### 15 Exempel 1

- Som testvätska har använts syntetisk urin till vilken har satts tillväxtmedium för mikroorganismer. Den syntetiska urinen innehåller mono- och divalenta kat- och anjoner samt urea och har beretts enligt uppgifter i Geigy, Scientific Tables, vol 1., 8:th ed. 1981 p 53.
- 20 Tillväxtmediet för mikroorganismer bygger på uppgifter om Hook- och FSA-media för enterobakterier.

#### Exempel 2

- För att studera bakteriell antagonism genomfördes försök enligt metoden "agar overlay". Metoden bygger på, att den tillväxthämmande substansen,
- 25 som produceras av laktobakterierna, diffunderar genom ett agarskikt och hämmar tillväxten av testorganismerna.

- Mjölksyrabakterier, 5 stammar av Lactobacillus och 3 stammar av Lactococcus, odlades till en övernattskultur i lämplig buljong. Lactococcus odlades i M17 och Lactobacillus odlades i MRS. Agar (2%) av M17 resp
- 30 MRS (25 ml) blandades med 1,0 ml av respektive bakterie och gjöts i en petriskål. Agarplattorna inkuberades över natt i 37°C. Plattorna med MRS i inkuberades i CO<sub>2</sub>-atmosfär. Kontrollplattor bereddades på motsvarande sätt men utan mjölksyrabakterier. Ett nytt lager med 25 ml agar gjöts ovanpå det befintliga lagret i petriskålarna och fick stelna.

Testorganismerna i form av gramnegativa bakterier av resp *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp och *Proteus* spp, resp 100, 91 och 50 stammar, odlades upp i buljong, och en spädning motsvarande  $10^7$  cfu/ml bereddes i

Bertanitråg. Därefter stämplades testbakterierna på det nya agarlagret

- 5 med hjälp av en sk "steers steel pin replicator". Plattorna inkuberades i  $37^{\circ}\text{C}$  under 24 timmar. Efter inkubering avlästes plattorna och jämfördes med kontrollplattorna. För respektive testorganism registrerades vid avläsning "växt", "hämning" eller "nollväxt". I alla agarlager mättes pH, och plattor med pH under 5,0 testades om med pH-justerad agar.

- 10 Resultaten är sammanställda i tabell 1-6 samt i fig. 1. Den procentuella andelen av totala antalet testorganismer som hämmats eller gett nollväxt beräknades. Av resultaten framgår, att tillväxten av resp testorganismer *Escherichia coli*, *Klebsiella* och *Proteus* hämmas kraftigt av närvaron av genera *Lactobacillus* medan viss hämning erhålls med närvaro av genera
- 15 *Lactococcus*.

#### Testorganism *Escherichia coli*

Lactococcus nr	Växt antal	hämning antal	nollväxt antal	hämning eller nollväxt %
L 3	85	14	1	15
L 4	91	9	1	10
L 5	65	7	28	35
L 9	4	0	96	96
L 26	0	0	100	100

Tabell 1

#### Testorganism *Escherichia coli*

Lactobacillus nr	Växt antal	hämning antal	nollväxt antal	hämning eller nollväxt %
LB 13	0	0	100	100
LB 14	0	2	98	100
LB 16	0	2	98	100

Tabell 2



Testorganism *Klebsiella* spp

Lactococcus nr	Växt antal	hämning antal	nollväxt antal	hämning eller nollväxt %
L 3	68	16	7	25
L 4	71	23	6	32
L 5	64	10	17	29
L 9	51	10	30	44
L 26	34	36	21	63

Tabell 3

Testorganism *Klebsiella* spp

Lactobacillus nr	Växt antal	hämning antal	nollväxt antal	hämning eller nollväxt %
LB 13	0	0	91	100
LB 14	62	22	7	32
LB 16	0	0	91	100

Tabell 4

5 Testorganism *Proteus* spp

Lactococcus nr	Växt antal	hämning antal	nollväxt antal	hämning eller nollväxt %
L 3	47	2	1	6
L 4	49	1	0	2
L 5	39	7	4	22
L 9	45	4	1	10
L 26	36	8	6	28

Tabell 5

Testorganism *Proteus* spp

Lactobacillus nr	Växt antal	hämning antal	nollväxt antal	hämning eller nollväxt %
LB 13	0	0	50	100
LB 14	10	19	21	80
LB 16	2	7	41	96

Tabell 6

## Exempel 3

- 5 testprodukter tillverkades bestående av en massakropp bestående av en fiberblandning av 50% kemitermomekanisk cellulosamassa och 50% kemisk cellulosamassa med tillsats av ca 5% superabsorberande material. Massakroppen var innesluten mellan ett genomsläppligt nonwovenmaterial med en ytvikt av 23 g/m<sup>2</sup> och ett tätt baksidesmaterial av 33 µm polyetenfilm. Mellan nonwovenmaterialet och massakroppen placerades ett skikt av polyestervadd med en ytvikt av 65 g/m<sup>2</sup>. Mellan vadden och massakroppen placerades en blandning av frystorkade laktobakterier av genus *Lactobacillus* och i en mängd av 10<sup>8</sup> st per testprodukt. Därefter tillfördes 50 ml syntetisk urin enligt exempel 1 till massakroppen. Förekomsten av laktobakterier i ljumsken och vid mynningen av urethra hos 5 testpersoner mättes, varefter testpersonerna bar resp testprodukter på samma sätt som en blöja eller dambinda under 2 timmar. Därefter mättes åter förekomsten av laktobakterier i ljumsken och vid mynningen av urethra hos testpersonerna. Resultaten redovisas i tabell 7. Ur tabellen framgår, att de frystorkade laktobakterierna aktiveras, då testprodukterna bärs av testpersonerna, och även att dessa laktobakterier överförs till testpersonerna.

Testperson	Startvärde urethra, antal lakto- bakterier	Startvärde ljumske, antal lakto- bakterier	Efter 2 tim urethra, antal lakto- bakterier	Efter 2 tim ljumske, antal lakto- bakterier
Nr 1	ingen växt	ingen växt	$3,6 \times 10^3$	$1,5 \times 10^4$
Nr 2	ingen växt	ingen växt	$2,8 \times 10^3$	$2,7 \times 10^2$
Nr 3	ingen växt	ingen växt	$1,4 \times 10^3$	$8,4 \times 10^2$
Nr 4	ingen växt	ingen växt	$3,8 \times 10^6$	$4,0 \times 10^3$
Nr 5	ingen växt	ingen växt	$4,5 \times 10^3$	$8,6 \times 10^2$

Tabell 7

Uppfinningen är naturligtvis inte begränsad till visade utföringsexempel, utan är givetvis tillämpbar för andra utföringsformer inom ramen för efterföljande patentkrav.

Patentkrav

1. Absorberande alster såsom en blöja, dambinda, tampong eller liknande, till vilket har tillsatts mikroorganismer, k ä n n e t e c k n a t a v att sagda tillsatta mikroorganismer är så valda, att de vid  
5 regelbunden användning av det absorberande alstret under kortare eller längre tid uppvisar antagonistiska egenskaper mot, i det absorberande alstret eller i perineum på bäraren av sagda alster, närvarande oönskade stammar av mikroorganismer, och att sagda mikroorganismer är tillsatta i sådan mängd, och att sagda mikroorganismer har sådan aktivitet, att  
10 tillväxten av oönskade species av mikroorganismer härvid förhindras.
2. Absorberande alster enligt krav 1, k ä n n e t e c k n a t a v att de mikroorganismer som uppvisar antagonistiska egenskaper är bakterier.
3. Absorberande alster enligt krav 2, k ä n n e t e c k n a t a v att de antagonistiska bakterierna är hämtade ur genera Lactobacillus eller  
15 Lactococcus med antagonistiska egenskaper.
4. Absorberande alster enligt krav 3, k ä n n e t e c k n a t a v att de antagonistiska bakterierna är hämtade ur species Lactobacillus acidophilus, Lactobacillus curvatus, Lactobacillus plantarum eller Lactococcus lactis.
- 20 5. Absorberande alster enligt krav 1, k ä n n e t e c k n a t a v att antalet antagonistiska mikroorganismer per absorberande alster överstiger  $10^6$  cfu, företrädesvis  $10^8$  cfu och helst  $10^9$  cfu.
6. Absorberande alster såsom en blöja, dambinda, tampong eller liknande innefattande ett genomsläppligt ytmaterial avsett att vid  
25 användning vara vänt mot bäraren, ett företrädesvis vätsketätt baksidesmaterial avsett att vid användning vara vänt bort från bäraren och en absorberande struktur placerad mellan ytmaterialet och baksidesmaterialet och att till det absorberande alstret har tillsatts mikroorganismer, k ä n n e t e c k n a t a v att sagda tillsatta  
30 mikroorganismer är så valda, att de vid regelbunden användning av det absorberande alstret under kortare eller längre tid uppvisar antagonistiska egenskaper mot, i det absorberande alstret eller i perineum på bäraren av sagda alster, närvarande oönskade stammar av mikroorganismer, och att sagda mikroorganismer är tillsatta i sådan

mängd, och att sagda mikroorganismer har sådan aktivitet, att tillväxten av oönskade species av mikroorganismer härvid förhindras.

5 7. Absorberande alster enligt krav 6, k ä n n e t e c k n a t a v att de mikroorganismer som uppvisar antagonistiska egenskaper är placerade i ytmaterialet av det absorberande alstret.

8. Absorberande alster enligt krav 6, k ä n n e t e c k n a t a v att de mikroorganismer som uppvisar antagonistiska egenskaper är placerade i den absorberande strukturen hos det absorberande alstret.

10 9. Absorberande alster enligt krav 6, k ä n n e t e c k n a t a v att de mikroorganismer som uppvisar antagonistiska egenskaper är placerade i en lös iläggsprodukt i det absorberande alstret.

10. \_ Absorberande alster enligt krav 6, k ä n n e t e c k n a t a v att de mikroorganismer som uppvisar antagonistiska egenskaper är placerade mellan två av skikten i det absorberande alstret.

### Sammanfattning

- Uppfinningen hänför sig till absorberande alster t ex blöjor, och liknande artiklar och avser metoder, som syftar till att förhindra oönskad lukt och/eller förhindra tillväxt av oönskade mikroorganismer i samband med
- 5 användning av nämnda artiklar, och avser att åstadkomma ett absorberande alster som möjliggör användning av alstret även under längre tid, utan att oönskad lukt, infektionsrisk, eller negativ hudpåverkan uppstår. Ett ytterligare syfte är att stärka förekomsten i bärarens perineum av sådan mikrobiologisk flora, som hjälper till att förhindra
- 10 uppkomsten av urinvägsinfektioner. Dessa syften uppnås genom att till det absorberande alstret har satts mikroorganismer, som uppvisar antagonistiska egenskaper mot oönskade stammar av mikroorganismer så att tillväxten av dessa förhindras.